

PENGARUH POLYMORPHISME PVULL GEN RESEPTOR ESTROGEN ALFA TERHADAP KADAR KALSIUM DAN PHOSPHAT SERUM PADA WANITA POSTMENOPAUSE

EFFECT OF PVULL POLYMORPHISM ESTROGEN RECEPTOR ALPHA GENE IN SERUM CALCIUM AND PHOSPHATE LEVEL IN POSTMENOPAUSE WOMEN IN YOGYAKARTA

Prasetyastuti

Bagian Biokimia, FK UGM, Yogyakarta

ABSTRACT

Background: Estrogen has an important role in bone metabolism. The hypoestrogenemia condition occurring in postmenopausal women may affect bone metabolism. The mechanism action of estrogen to prevent the activity of osteoclast in bone resorption was mediated especially by estrogen receptor alpha gene (ESR1). The Pvull polymorphism that occurs in ESR1 gene may alter their expression and function.

Objectives: the aim of this research was to determine the difference of serum calcium and phosphate level in postmenopausal women with Pvull polymorphism of the Estrogen receptor alpha gene

Method: This was cross sectional design. The subjects are postmenopausal women 50-70 year old. Twenty seven subject divided into two group, group I consisted of 15 women with genotype PP,Pp and group II consisted of 12 with genotype pp. polymorphism were assessed by Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique. Determination of serum calcium and phosphate level used spectrophotometer. The data was analyzed with Independent sample t-test.

Results: The serum calcium level are $8,15 \pm 1,35$ mg/dl and $8,13 \pm 1,58$ mg/dl in genotype PP,Pp and pp respectively. The serum phosphate level are $3,8 \pm 0,47$ mg/dl and $4,24 \pm 0,86$ mg/dl in genotype PP,Pp and pp respectively

Conclusion: there were no statistically significant differences in serum calcium and phosphate level among genotype PP,Pp with pp ESR1 gene ($p > 0,05$)
Pvull polymorphism of ESR1 gene did not influence serum calcium and phosphate level in postmenopausal women.

Keywords: postmenopausal women, estrogen receptor polymorphism, serum calcium, serum phosphate

PENDAHULUAN

Menopause merupakan proses penuaan normal pada wanita akibat penurunan fungsi ovarium secara fisiologis yang umumnya terjadi pada usia rata-rata 51,5 tahun.¹ Penurunan fungsi ovarium secara fisiologis menyebabkan terjadinya perubahan pada beberapa organ tubuh seperti sistem kardiovaskular dan tulang. Perubahan ini terkait dengan kondisi hypoestrogenemia. Salah satu perubahan akibat hypoestrogenemia pada wanita postmenopause adalah peningkatan resorpsi tulang yang tidak diimbangi oleh aktivitas osteoblast.²

Estrogen berperan dalam remodeling tulang melalui efek antiresorptif pada tulang dengan cara inhibisi sitokin-sitokin.^{3,4} Efek antiresorptif estrogen tersebut dimediasi oleh reseptor estrogen, salah satunya adalah *estrogen receptor alfa (ESR1)*. ESR1 ini berperan dominant dalam memediasi efek estrogen pada tulang. ESR1 dikode oleh gen yang

terletak pada kromosom 6q25 dengan 8 exon sepanjang 140 kb.⁵

Polimorfisme merupakan suatu kondisi dimana terdapat perbedaan urutan basa DNA pada kromosom homolog yang menghasilkan pola berbeda dalam panjang fragmen restriksi.⁶ Polimorfisme merupakan salah satu tipe perbedaan genetik pada manusia yang dibawa sejak lahir dan tidak terkait usia.⁷

Polimorfisme pada gen ESR1 yang telah diketahui adalah Pvull IVSI -397T→C *restriction fragment length polymorphism* pada intron 1 gen ESR1. dan polimorfisme XbaI IVSI -351A→G yang terletak 50 bp di *downstream* sisi polimorfisme Pvull. Meskipun polimorfisme Pvull terjadi di intron yang merupakan region nonfunngsional dalam sebuah gen, secara teoritis polimorfisme dapat mempengaruhi sintesis protein melalui terganggunya produksi mRNA karena intron 1 memiliki *regulatory sequences* yang bekerja sebagai *enhancer* produksi

mRNA.^{5,8} Meskipun intron 1 tidak mengkode protein, polimorfisme intron 1 dapat menurunkan ekspresi gen reseptor estrogen alfa sehingga menurunkan kerja estrogen dalam sel akibatnya aktivitas osteoklas meningkat. Peningkatan aktivitas osteoklas ini akan mengakibatkan rentan terhadap osteoporosis. Polimorfisme PvuII dan XbaI pada intron 1 gen ESR1 diduga berperan dalam peningkatan resorpsi tulang akibat berkurangnya inhibisi aktivitas osteoklastik oleh estrogen.⁵ Peningkatan aktivitas resorpsi menyebabkan tulang kehilangan sejumlah besar kalsium yang berperan sebagai struktur utama penyusun tulang. Kalsium yang teresorpsi ini akan dilepaskan ke dalam cairan ekstraseluler sehingga menyebabkan kenaikan kadar kalsium dalam serum.

Kalsium dan fosfat adalah makromineral yang diperlukan tubuh lebih dari 100 miligram setiap harinya. Kedua mineral tersebut merupakan konstituen tulang sebagai hidroksiapatit $[10\text{Ca}:6(\text{PO}_4)(\text{OH})_2]$ memberikan kekuatan dan kekerasan pada tulang dan menyimpan 99% kalsium tubuh dan 85% fosfat tubuh. Hipokalsemia sebagai kompensasi dari hipersekresi hormon paratiroid dapat mengakibatkan hiperparatiroid sekunder. Peningkatan kadar hormon paratiroid tersebut menyebabkan osteoblas melepaskan molekul yang memacu aktivitas osteoklast. Hipofosfatemia menginduksi paratiroid sekunder karena fosfat mengatur sekresi hormone paratiroid. Setelah menopause masa tulang berkurang hingga 2% (tulang cortical) dan 9% (tulang cancellous) setiap tahunnya. Wanita dapat kehilangan sebanyak 35% tulang cortical dan 50% tulang trabeculer dalam 30-40 tahun setelah menopause.

Pengaruh polimorfisme PvuII dan XbaI gen ESR1 terhadap aktivitas resorpsi tulang masih kontroversial. Menurut Salmen *et al.*⁹ genotipe polimorfisme PvuII gen ESR1, PP;Pp dan pp memiliki resiko penurunan massa tulang yang lebih cepat dibanding dengan genotip pp pada wanita postmenopause di Finlandia. Peneliti lain nya menemukan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara polimorfisme PvuII dengan peningkatan fraktur osteoporotik pada wanita di Eropa¹⁰, sehingga pengaruh polimorfisme PvuII gen ESR1 terhadap aktivitas resorpsi tulang dilihat dari kadar kalsium dan kadar fosfat serum masih perlu dilakukan.

Polimorfisme IVSI -397 T → C dapat ditentukan dengan retriksi endonuklease PvuII sehingga

genotipnya ditulis PP, Pp, dan pp. Polimorfisme IVSI -351 A → G dapat ditentukan dengan retriksi endonuklease XbaI sehingga genotipnya ditulis XX, Xx dan xx Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh polimorfisme PvuII gena ESR1 genotype PP,Pp and pp terhadap kadar kalsium dan fosfat serum wanita postmenopause

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observational dengan rancangan potong lintang (*cross sectional*). Subyek penelitian adalah wanita postmenopause usia 50 - 70 tahun sebanyak 27 orang yang berdomisili di Desa Besole Kecamatan Gamping, Sleman Yogyakarta. Subyek penelitian dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok I berjumlah 15 orang wanita postmenopause dengan genotype PP,Pp gen reseptor estrogen alfa, sedangkan kelompok II berjumlah 12 orang wanita postmenopause dengan genotip pp gen reseptor estrogen alfa. Kriteria inklusi adalah wanita postmenopause usia 50-70 tahun. Eksklusi dilakukan pada wanita dengan hipertensi, diabetes mellitus, gangguan fungsi hepar, dan penyakit kardiovaskular. Variabel independen adalah polimorfisme gen estrogen reseptor alfa pada intron 1 genotip PP,Pp dan genotype pp. Variabel dependen adalah kadar kalsium dan fosfat serum yang dinyatakan dalam mg/dl

Sampel darah vena sebanyak 6 mililiter diambil dari vena kubiti mediana subyek penelitian yang telah menandatangani *inform consent*. Darah sebanyak 3 mililiter dimasukkan kedalam tabung yang berisi EDTA (1 mg/ml darah) digunakan untuk pemeriksaan DNA. Sisanya sebanyak 3 mililiter dimasukkan ke dalam tabung bebas mineral untuk pemeriksaan kalsium dan fosfat.

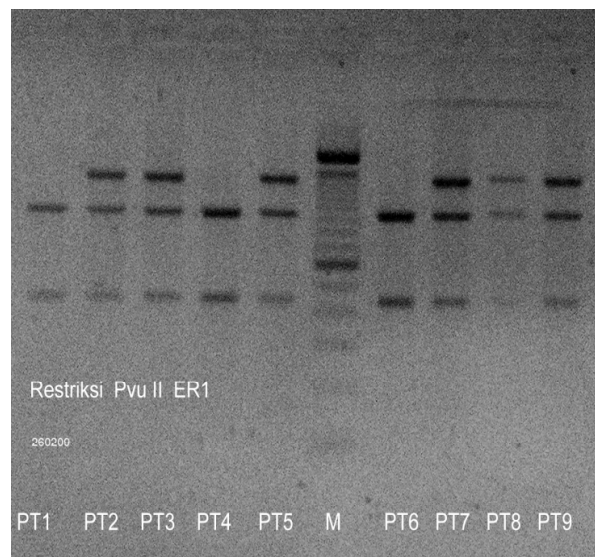
Kadar kalsium dan fosfat serum diukur dengan menggunakan spektrofotometer (DiaSys). Polimorfisme ditentukan dengan teknik *polymerase chain reaction- restriction fragmen length polymorphism* (PCR-RFLP). Ekstraksi DNA menggunakan *QIAmp Blood Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Jerman). DNA diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR. *Primer forward* yang digunakan adalah 5' CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTATTC TCC – 3', dan *primer reverse*: 5' – TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA – 3' menghasilkan PCR produk sepanjang 1.3 kb.

Pemotongan PCR produk dilakukan dengan enzim nuclease restriksi Pvu II (TaKaRa, Tokyo, Jepang). untuk polimorfisme IVSI -397 T → C Hasil digesti di analisa dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dan divisualisasi dengan etidium bromide. Hasil elektroforesis adalah: genotype PP dikenali dengan tidak terdapatnya sisi restriksi sepanjang fragmen 1.3 kb, genotype pp dikenali dengan adanya sisi restriksi Pvu II pada kedua allele yang di digesti menjadi 2 fragmen sepanjang 0.85 dan 0.45 kb.⁵ Perbedaan kadar kalsium dan kadar fosfat serum pada wanita postmenopause genotype PP,Pp dan genotype pp dianalisa dengan *Independent sample t-test*. Hasil dinyatakan signifikan jika $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis restriksi PvuII ESR1 menggunakan gel agarose 2 % dan visualisasi dengan etidium bromide dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. merupakan hasil elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dan visualisasi dengan etidium bromide. Genotip PP dikenali dengan tidak terdapatnya sisi restriksi PvuII sepanjang fragmen 1.3 kb, genotip pp dikenali dengan adanya sisi restriksi PvuII pada kedua allele yang di digesti menjadi 2 fragmen sepanjang 0,85 kb dan 0,45 kb.



Gambar 1. Restriksi PvuII ESR1

Tabel 1. Rerata kadar kalsium dan fosfat serum pada genotip PP,Pp dan pp wanita postmenopause ($\bar{X} \pm SD$)

	genotip PP,Pp	genotype pp	P value
Kalsium (mg/dl)	$8,15 \pm 1,35$	$8,13 \pm 1,58$	0,975
Fosfat (mg/dl)	$3,80 \pm 0,47$	$4,26 \pm 0,86$	0,075
Jumlah sampel	15	12	

Rerata kadar kalsium serum wanita postmenopause dengan genotip PP,Pp sebesar $8,15 \pm 1,35$ mg/dl lebih tinggi dibanding genotype pp sebesar $8,13 \pm 1,58$ mg/dl. Perbedaan ini tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Rerata kadar kalsium wanita postmenopause dengan genotip PP,Pp dan genotype pp pada penelitian ini nilainya di bawah normal (nilai normal untuk kalsium 8,6 – 10,3 mg/dl).

Rerata kadar fosfat serum wanita postmenopause dengan genotip PP,Pp sebesar $3,80 \pm 0,47$ mg/dl lebih rendah dibanding genotype pp sebesar $4,26 \pm 0,86$ mg/dl, namun perbedaan ini tidak signifikan secara statistik ($p > 0,05$). Rerata kadar fosfat wanita postmenopause dengan genotip PP,Pp dan pp pada penelitian ini nilainya dalam batas normal

PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang melibatkan 27 wanita postmenopause usia 50-70 tahun ini menunjukkan adanya perbedaan yang tidak signifikan kadar kalsium dan fosfat serum pada polimorfisme PvuII gen ESR1. Subyek penelitian memiliki rata-rata kadar kalsium $8,15 \pm 1,35$ mg/dl pada genotip PP dan Pp sedang genotip pp sebesar $8,13 \pm 1,58$ mg/dl, nilai ini dibawah nilai normal ($< 8,6$ mg/dl). Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Salmen *et al*,⁹ yang menemukan kadar kalsium serum yang normal baik pada genotip PP,Pp dan pp pada wanita postmenopause di Finlandia. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan ekskresi dan asupan kalsium serta aktifitas fisik subyek yang tidak diukur pada penelitian ini. Perbedaan Asupan kalsium yang rendah (< 700 mg/hari) dapat menyebabkan absorpsi kalsium kedalam darah menjadi berkurang. Ekskresi kalsium dalam urin 24 jam yang tinggi walaupun disertai dengan asupan kalsium yang normal juga dapat menyebabkan rendahnya kadar kalsium di dalam darah.¹¹ Kadar kalsium dan fosfat serum merupakan salah satu indeks biokimia yang mencerminkan kepadatan mineral dalam tulang yang didominasi oleh kalsium. Kepadatan mineral tulang ini dipengaruhi antara lain oleh menopause, berat badan, tinggi badan, usia, genetic, dan diet.^{12,13} Menopause berkaitan erat dengan kadar kalsium serum. Kondisi hipoestrogenemia yang terjadi pada menopause dapat mengakibatkan peningkatan resorpsi tulang yang dapat berakibat peningkatan kadar kalsium dalam serum.

Perbedaan hasil penelitian ini dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Salmen *et al.*⁹ Rata-rata kadar fosfat serumnya pada genotip PP dan Pp adalah $3,80 \pm 0,47$ mg/dl lebih rendah dibanding genotip pp sebesar $4,26 \pm 0,86$ mg/dl. namun secara statistik tidak signifikan ($p > 0,05$). Rerata kadar fosfat tersebut dalam batas normal (2,45–4,5 mg/dl). Hasil ini sesuai dengan penelitian Salmen *et al.*⁹ yang menemukan kadar fosfat serum yang normal baik pada genotip PP, Pp dan pp pada wanita postmenopause di Finlandia. Di Cina oleh Ho *et al.*¹⁴ dan di Argentina oleh Perez *et al.*¹²

KESIMPULAN

Polymorfisme PvuII gena ESRI tidak mempengaruhi kadar kalsium dan fosfat serum pada wanita postmenopause.

KEPUSTAKAAN

1. Hurd WW, Ames LS, Menopause. In: Berek, J.S Ed). Novak's Gynecology. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. 2002: 370-5.
2. Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Setiati S. (Eds.): Ilmu Penyakit Dalam Edisi IV. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 2006:1096-1105.
3. Compston JE., sex steroid and bone. Phys Rev 2001; 81(1).
4. Gruber Christian J, Production and Action of Estrogens. N eng J med; 2002; 346(5): 340-52.
5. Gennari L, Merlotti D, de Paola V, Becherini L. estrogen receptor gene polymorphism and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. Am J Epid, 2005;161(4).
6. Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG. Biologi edisi kelima. Erlangga, Jakarta. 2002.
7. Shastri BS. SNP alleles in human diseases and evolution. J Hum. Genet, 2002; 47: 561-6.
8. Laurie CC, Stam LF, The effect of an intronic polymorphism on alcohol dehydrogenase expression in drosophila melanogaster. Genetics, 1994;138:379-85.
9. Salmen T, Heikkinen A, Mahonen A, Kroger H. Early postmenopausal bone loss is associated with PvuII estrogen receptor gene polymorphism in Finnish Women: effect of hormone replacement therapy. J Bone Miner Res, 2000; 15 (2).
10. Ioannidis JPA, Starvrou I, Trikalonos TA, Zois C. Association of polymorphisms of the estrogen receptor a with bone mineral density and fracture risk in women: a meta- analysis. J Bone Mine Res, 2002;7(11).
11. Nam HS, Shin MH, Kweon SS, Park KS. Association of estrogen receptor a with bone mineral density in postmenopausal Korean women. J Bone Miner Metab, 2005; 234: 84-89.
12. Perez A, Ulla M, Garcia B, Lavezzo M. Genotypes and clinical aspects associated with bone mineral density in Argentine postmenopausal women. J Bone Miner Metab, 2008;26:358-65.
13. Wang CL, Tang XY, Chen WQ, Su YX. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphism with bone mineral density in Chinese women a meta-analysis. Osteoporosis Int 2007;18: 295-305.
14. Ho AYY, Yeung SSC, Kung AWC. PvuII polymorphism of the estrogen receptor and bone mineral density in healthy southern Chinese women. Calcif Tissue Int, 2000;66:405-408.